

Mainz 1976

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERWACHUNG DER SCHWANGERSCHAFT
DURCH BESTIMMUNG VON OESTRIOL IM PLASMA

Erika Schuy

1976



Aus der Abteilung für Experimentelle Endokrinologie,
Frauenklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERWACHUNG DER SCHWANGERSCHAFT
DURCH BESTIMMUNG VON OESTRIOL IM PLASMA



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Erika Schuy
aus Graz/Österreich

Mainz 1975

Fachbereichsdekan: Prof.Dr. H.Langendorf
Referent: Prof.Dr. G.W.Oertel
Korreferent: Prof.Dr. V.Friedberg



Tag der mündlichen Prüfung : 8. Juli 1976

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	Seite 1
MATERIAL	8
METHODIK	8
ERGEBNISSE	11
DISKUSSION	21
ZUSAMMENFASSUNG	29
LITERATURVERZEICHNIS	30
DANKSAGUNG	33
LEBENS LAUF	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

In der Geburtshilfe hat die Überwachung von Risikoschwangerschaften im Laufe der letzten Jahre beträchtlich an Bedeutung gewonnen. Wie aus der nachfolgenden Tabelle hervorgeht, stehen für die Kontrolle der Plazentafunktion zahlreiche Labormethoden zur Verfügung. Die diagnostische Bedeutung einer derartigen Methode ist leicht zu beurteilen, wenn Laborbefund und Pathophysiologie in Zusammenhang gebracht werden können wie z.B. Hypoöstrogenämie und hypoplastisches Genitale oder Glukosämie und Diabetes. Bei dem Versuch, eine Korrelation zwischen abnormen Laborbefunden und klinischem Zustand nachzuweisen, zeigte es sich, daß die zu korrelierenden klinischen Daten allerdings nur in unvollkommener Weise angegeben werden können. Bezeichnungen wie drohender Abort, EPH-Gestose, Praeeklampsie und in gewissem Sinne auch Diabetes sind im großen und ganzen Hilfskonstruktionen für uneinheitliche pathologische Zustände mit unklarer Ätiologie und mit unvorhersehbaren Auswirkungen auf den Fetus, dessen Zustand letztlich charakterisiert werden soll. Auf der anderen Seite bringt eine weitergehende Homogenisierung einzelner Gruppen der abnormen Schwangerschaften eine Verkleinerung der Kollektive mit sich. Wenn die Resultate der in Tabelle 1 angeführten, relativ komplizierten Laborbestimmungen mit dem Schweregrad eines dieser pathologischen Zustände auch übereinstimmen, so ist damit noch keineswegs ein Fortschritt in der Diagnostik verbunden, da der Schweregrad bereits mit einfacheren Mitteln, wie etwa der Messung des Blutdruckes, des Harnstoffes oder der Glukose, charakterisiert werden kann. Auch die Korrelation solcher Labordaten mit dem Gewicht, dem

Tabelle 1

Methoden zur klinisch-chemischen

Überwachung der gefährdeten Schwangerschaft

(nach KUSS (14))

		Mol. Gewicht	Herkunft	Konzentration bzw. Aktivität (l ⁻¹)		Halbwertszeit im Serum
				Fruchtwasser	Serum	
Immunglobulin	IgG	160 000	mat. Lymphocyt	0,2 g	10 g	3 Wochen
Diamin-Oxydase	DaO	90 000	Dezidua	0,9 U	0,7 U	0,5 Wochen
Chorion-Gonadotropin	hCG	46 000	{ Cytotrophoblast/ Syncytiotrophoblast }	0,1 mg	5 mg	0,5 Tage
Placenta-Lactogen	hPL	20 000	Syncytiotrophoblast	0,6 mg	6 mg	0,25 Stunden
hitze-stabile alk. } Phosphatase	haP	116 000	Syncytiotrophoblast	0,1 U	20 U	0,5 Wochen
Cystin-Amino-peptidase	CAP	300 000	Syncytiotrophoblast	0,1 U	5 U	1 Woche
17 β -Hydroxysteroid- Oxydoreduktase	17 β - HO }	47 000	{ Trophoblast und Stroma }	—	25 mU	0,5 Tage
Progesteron	P	314	Syncytiotrophoblast	26 μ g	0,2 mg	0,5 Stunden
Östriol	Ö ₃	288	{ fet. Nebennierenrinde und Leber und Trophoblast }	0,2 mg	0,1 mg	0,5 Stunden
α_1 Fetoprotein	α Fp	70 000	fet. Leber	0,2 mg	0,2 mg	1 Woche
Hämoglobin F	HbF	67 000	fet. Erythrocyt	—	—	—
Bilirubin	Bi	585	fet. Erythrocyt	1 mg	—	—
Lecithin	L	752	fet. Lunge	50 mg	—	—

U = μ Mol Substratumsatz/min

Die Angaben entsprechen ungefähr dem Mittelwert der in der Literatur für das Ende der Tragzeit gefundenen Daten.

Aussehen oder etwa histologischen Besonderheiten der Plazenta läßt sich für die Zustandsdiagnose des Feten kaum verwenden, da die Plazentamorphologie ihre eigenen Interpretationsschwierigkeiten besitzt. So ist das angestrebte Ziel, die Labordaten in Zusammenhang mit dem Zustand des Feten zu bringen, nur annäherungsweise zu erreichen. Auch eine spätere Beurteilung des Neugeborenen läßt sich u.a. wegen des Einflusses der Geburtsmechanik nur in begrenztem Umfange verwerten. Ist doch selten eine Entscheidung möglich, ob der Wechsel vom intrauterinen zum extrauterinen Milieu den Zustand verbessert, verschlechtert oder unbeeinflußt gelassen hat. Alle diese Fragen sowie eine oft unzulängliche Dokumentation und Befunderfassung trugen dazu bei, daß oft die relative Brauchbarkeit der jeweiligen Bestimmungen nur grob abgeschätzt werden kann.

Trotz aller dieser Einschränkungen hat sich die Beurteilung der Oestriol-Produktion während der Schwangerschaft als Indikator des fetalen Wohlbefindens im Laufe der letzten Jahre bewährt (7, 10). Da die Oestrogene im Harn um etwa zwei Zehner-Potenzen konzentrierter vorliegen als im peripheren Blut, war ihre Bestimmung weniger problematisch und wurde als Methode zur Überwachung von Risikoschwangerschaften in vielen Laboratorien angewandt (19). Gegen Ende der Schwangerschaft werden täglich etwa 50 mg Oestrogen produziert und ausgeschieden (6, 30). Die wichtigste Voraussetzung für diese hohe Produktionsrate ist a) die Fähigkeit der mikrosomalen Fraktion der Plazenta, den Ring A der neutralen C_{19} -Steroide in den phenolischen Ring der Oestrogene oder C_{18} -Steroide umzuwandeln, und b) die Fähigkeit der normalen fetalen Nebennierenrinde und Leber, pro Tag etwa 75 mg der Oestrogenvorstufen bereitzustellen. Als Vorstufen dienen sulfokonjugiertes Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on) und dessen 16 α -Hydroxy-Derivat (3 β , 16 α -Dehydroxy-5-

androst-17-on). Die Oestriol-Synthese erfolgt nicht wie die Progesteron-Synthese vorwiegend aus Cholesterin des mütterlichen Blutes und dem aus Cholesterin in der Plazenta entstandenen Pregnenolon, sondern vorzugsweise aus obigen Vorstufen, die in fetalen Organen aus Acetat de novo synthetisiert werden. Während also das Enzymmuster des Syncytiotrophoblasten zur Progesteronsynthese aus Cholesterin ausreicht, muß für die Oestriolsynthese zusätzlich auf Enzymaktivitäten anderer Organe zurückgegriffen werden. Neben der Plazenta kann die Nebenniere der Schwangeren zur Oestrogensynthese einen Beitrag leisten, indem sie sulfokonjugiertes Dehydroepiandrosteron an das Blut abgibt. Etwa 10% der ausgeschiedenen Oestrogene entstehen auf diesem Wege. Der größte Teil der Phenolischen Steroide aber bildet sich aus dem sulfokonjugierten Dehydroepiandrosteron der fetalen Nebennierenrinde, die ebenso durch die eigene Hypophyse gesteuert wird wie das maternale Organ. Während auf dem maternoplazentaren Syntheseweg durch die Leber der Schwangeren nur ein geringer Teil der neutralen C₁₉-Steroide an C-16- hydroxyliert wird, entsteht der weitaus größte Teil der 16 α -hydroxylierten Steroide in der fetalen Leber. Aus diesem Grunde kommt es auf dem maternoplazentaren Syntheseweg vorwiegend zur Bildung von Oestradiol und Oestron, auf dem fetoplazentaren Syntheseweg dagegen vor allem von Oestriol und 15 α -hydroxylierten Produkten. Die Bestimmung des Oestriols gibt demnach Hinweise auf die Enzymaktivitäten fetaler Organe. Das entstandene Oestriol wird von der Plazenta über die Niere des Fetus an das Fruchtwasser und durch die Plazenta und/oder die Eihäute an das Blut der Schwangeren abgegeben (11, 13). In der maternalen Leber erfolgt dann eine Konjugation mit Glucuronsäure an C-16. Daneben werden aber auch Sulfate und Sulfoglucuronoside gebildet und zusammen mit den Oestriol-glucuronosiden im Primärharn aus dem Kreislauf entfernt. Die im Endharn

ausgeschiedene Menge ist demnach von der Filtrationsrate abhängig. Allerdings kann eine Sekretion von Oestriolkonjugaten im proximalen Tubulusabschnitt und eine Rückresorption im distalen Abschnitt nicht ausgeschlossen werden, so daß Diuretika durch Hemmung der Rückresorption die Oestriolausscheidung zu beeinflussen vermögen (26). Angaben über die Clearancerate sind wegen der Verschiedenheit der Oestriol-Verbindungen in Blut und Harn daher problematisch. Mit etwa 100 ml pro Minute ist die Oestriolclearance sicher größer als die von Oestron oder Oestradiol (5). Am Ende der Schwangerschaft enthält 1 Liter Fruchtwasser etwa 1.4 mg Oestriol, davon rund 0.2 mg als freies Steroid. Das Mengenverhältnis der Oestriol-Abkömmlinge ähnelt hier übrigens dem des fetalen Harns (13). In 1 Liter Schwangerenserum findet man dagegen nur 300 µg Gesamt-Oestrogene, wovon 10 µg auf freies Oestriol und 120 µg auf konjugiertes Oestriol entfallen (1). Im Schwangerenharn dagegen werden annähernd 30 - 50 mg Oestrogene ausgeschieden, von denen 80% als Oestriol-16-glucuronosid vorliegen (27).

Was die in der Praxis bislang gebräuchlichen Bestimmungen von Oestriol im Harn betrifft, so lassen sich zwei Zielrichtungen erkennen (15, 23). Dem jeweiligen Zweck entsprechend wird entweder die Spezifität oder die Praktikabilität der Methode höher bewertet. Bei ersteren Verfahren handelt es sich ganz allgemein um sog. Oestriolbestimmungen, bei den letztgenannten Methoden dagegen um Analyse der Gesamtoestrogene. Die Spezifität einer Bestimmungsmethode ist aber für die Oestriolbestimmung im Blut von entscheidender Bedeutung; weniger dagegen für die Erfassung des Oestriols im Urin, da der Oestriolanteil am Gesamtoestrogengehalt beider Flüssig-

keiten sehr verschieden ist. Methoden zur Bestimmung von Oestriol oder der Gesamt-Oestrogene im Harn sind seit geraumer Zeit hinlänglich bekannt (30). Beide Arbeitsrichtungen wurden in der Zwischenzeit durch radioimmunologische Verfahren bereichert. Für die Oestriolbestimmung sind dabei Anti-Oestriol-C-6-Konjugat-Antiseren empfohlen worden (9). Für die Gesamtoestrogenbestimmung in der Schwangerschaft aber eignen sich besonders Anti-Oestriol-C-16, C-17-Dikonjugat-Antiseren (15). Trotz der durch diese Analysenverfahren möglichen Verbesserungen werden in den meisten Laboratorien noch die photometrischen Verfahren zur Bestimmung von Oestriol im Schwangerenharn durchgeführt. Bei derartigen Routineuntersuchungen kann die Spezifität der Oestriolbestimmung zugunsten seiner Praktikabilität vernachlässigt werden, vorausgesetzt, daß die Präzision der Methode unter Kontrolle steht. Hier dürfte die fehlende Qualitätskontrolle der Oestrogenanalytik häufig eine Ursache von Mißerfolgen in der klinisch-chemischen Überwachung von Risikoschwangerschaften darstellen (14). Obgleich in der letzten Zeit sich ein Trend zur Serumanalyse von Oestrogenen abzeichnet, so ist doch unklar, ob in der Zukunft die Serum- oder die Urin-Oestrogenbestimmung die größere Bedeutung für die Klinik gewinnt; liegen doch noch zu wenig Erfahrungen mit Serumanalysen vor (16). Wahrscheinlich kann kein Verfahren das andere völlig ersetzen. Die Möglichkeiten zur sofortigen Probenahme läßt die Serumuntersuchung besonders vorteilhaft erscheinen. Als Nachteil dagegen ist die geringere Dämpfung durch den Tagesrhythmus anzusehen, die zwangsläufig auftritt, weil nicht über die Zeit integriert wird (21). Häufigere Venenpunktionen beim gleichen Patienten lassen sich nicht immer erreichen. Wie weit Oestriol und Oestriol-Konjugat-Konzentrationen im Serum dissoziieren können und ob beide Werte verschiedene Zustände charakteri-

sieren, war bislang unbekannt. Harnuntersuchungen werden wegen der längeren Anlaufzeit ungünstig beurteilt. Eine Verkürzung der Sammelzeit und die Ermittlung des Oestriol-Kreatinquotienten kann nur als Notbehelf zur Schätzung der Oestriolausscheidung angesehen werden (17). Die Tag-zu-Tag-Varianz der Oestrogenausscheidung wird häufig überschätzt, da hier Sammelfehler und Analysenfehler zusätzlich eingehen. Sammelfehler sind durch sorgfältiges Befragen und/oder Kreatininbestimmung aufzudecken, Analysenfehler durch die interne Qualitätskontrolle (14).

Aufgrund der letztgenannten Schwierigkeiten bei der Schwangerschaftsüberwachung mit Hilfe von Oestriolbestimmung im Harn befassen sich die nachfolgenden Untersuchungen mit der Bestimmung des freien und des Gesamtoestriols im Plasma sowie einer Korrelation besagter Parameter. Außerdem soll in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen Oestriol und seiner Vorstufe Dehydroepiandrosteron bei einzelnen Fragestellungen überprüft werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

MATERIAL

Für die nachstehenden Untersuchungen wurde heparinisiertes Plasma von 267 gesunden Schwangeren bei einer Schwangerschaftsdauer von 29 bis 42 Wochen benutzt. Bei fünf weiteren gesunden Schwangeren entnahm man zum Nachweis eines circadianen Rhythmus der Oestriolspiegel jeweils Blutproben um 8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00 und 4:00. Eine Verlaufskontrolle des freien Oestriols im Plasma während der Schwangerschaft wurde bei zwei Schwangeren durch wöchentliche Analyse von der 24. - 40. bzw. 30. - 41. Schwangerschaftswoche durchgeführt.

METHODIK

Bestimmung von freiem Oestriol im Plasma

Die quantitative Bestimmung des freien Oestriols erfolgte durch Radioimmunoassay unter Verwendung eines spezifischen Antiserums, welches mittels Immunisierung mit einem Oestriol-6-O-carboxymethyl-oxim-BSA als Hapten gewonnen wurde und im Handel erhältlich ist (CEA-IRE-SORIN, Isotopendienst West, Frankfurt, BRD). Der Anwendungsvorschrift gemäß wurde die Extraktion des freien Oestriols mit 3.0 ml Äther/0.1 ml Plasma oder Serum durchgeführt. Für den eigentlichen Radioimmunoassay kamen zwei Aliquote des Ätherextraktes zur Anwendung. Die Auswertung geschah im BF Betaszint Spectrometer mit Alphatronic.

Bestimmung des Gesamt-Oestriols im Plasma

Nach Vorversuchen, in deren Verlauf die Spaltung von Oestriolkonjugaten durch Säurehydrolyse hinsichtlich Säurekonzentration, Hydrolysetemperatur und Dauer der Hydrolyse eingehend überprüft wurde, erwies sich folgende Aufarbeitung als geeignet:

0,1 ml heparinisiertes Plasma wird mit 0.9 ml Wasser verdünnt und ein Aliquot von 0.1 ml - in Duplikat - mit 2.0 ml 2 N Salzsäure versetzt. Man erhitzt 60 min. im siedenden Wasserbad, kühlt unter Leitungswasser und versetzt mit einer Spatelspitze Natriumchlorid. Nach Lösung des Salzes wird das Hydrolysat mit 10 ml Diäthyläther im Rotationsextraktor extrahiert. Die Reinigung des Extraktes erfolgt durch Ausschütteln mit 2 ml Carbonatpuffer von pH 10 und anschließend 2 ml Wasser. Der gereinigte Ätherextrakt wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand dem oben erwähnten Radioimmunoassay unterworfen.

Bestimmung von Dehydroepiandrosteron im Plasma

Für die Bestimmung des Gesamt-Dehydroepiandrosterons wurde die an anderer Stelle (28) ausführlich beschriebene Routinemethode benutzt, die sich aus der Extraktion der freien Steroide und der Steroid-Konjugate, Solvolyse der Konjugate, Dünnschichtchromatographie der 17-Oxosteroide, Umwandlung in 2,4-Dinitrophenylhydrazone und Densitometrie der Derivate im Schoeffel Spektraldensitometer SD 3000 zusammensetzt.

Folgende Abkürzungen bzw. Trivialnamen wurden benutzt:

Oestron	3-Hydroxy-1,3,5(10)-oestratrien-17-on
Oestradiol	1,3,5(10)-Oestratrien-3,17 β -diol
Oestriol	1,3,5(10)-Oestratrien-3,16 α ,17 β -triol
DHEA	Dehydroepiandrosteron, 3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on

ERGEBNISSE

In der Abb. 1 sind die Resultate der Analysen von freiem Oestriol im Plasma in Form der Mittelwerte und der zugehörigen Standardabweichung zusammengefaßt. Abb. 2 zeigt die entsprechenden Ergebnisse der Bestimmung des Gesamt-Oestriols im Plasma. In der Abb. 3 findet man die Plasmaspiegel freien Oestriols bei der Untersuchung des cirkadianen Rhythmus, während die entsprechenden Plasmaspiegel des Gesamt-DHEA's in Abb. 4 zu sehen sind. Die Verlaufskontrolle freien Oestriols und des Gesamt-DHEA's im Plasma bei fortschreitender Schwangerschaft ist in den Abb. 5 und 6 dargestellt. Abb. 7 gibt eine Verlaufskontrolle bei leichter EPH-Gestose, Abb. 8 eine solche bei vorliegender Glomerulonephritis und Abb. 9 die Verlaufskontrolle bei manifestem Diabetes der Schwangeren wieder.

Abbildung 1:

Freies Oestriol im Plasma während der Schwangerschaft

Der Zusammenhang zwischen den beiden Parametern Schwangerschafts-
wochen (W) und der Konzentration des freien Oestriols im Plasma
(ng/ml) ist statistisch hoch significant.

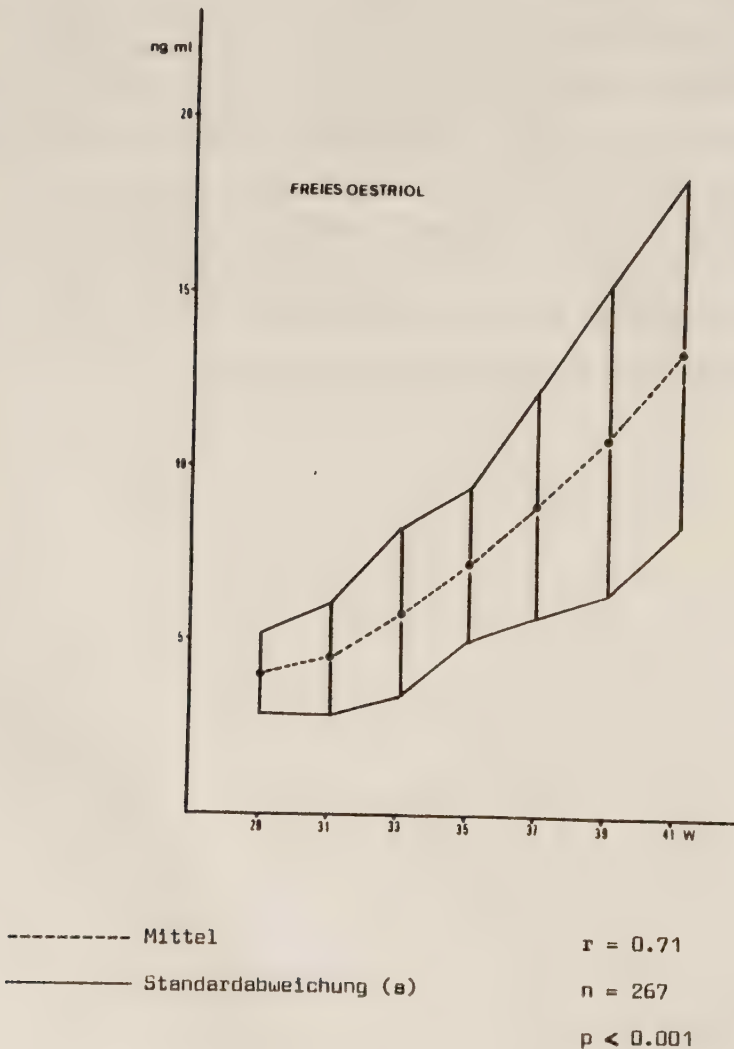
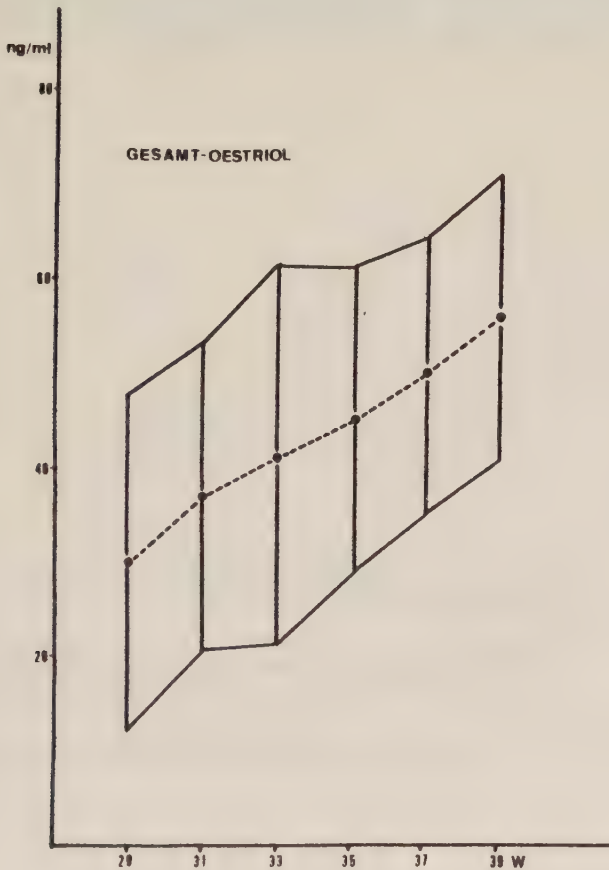


Abbildung 2:

Gesamt-Oestriol im Plasma während der Schwangerschaft

Der Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ist statistisch.
significant.



----- Mittel

----- Standardabweichung (s)

$r = 0.53$

$n = 267$

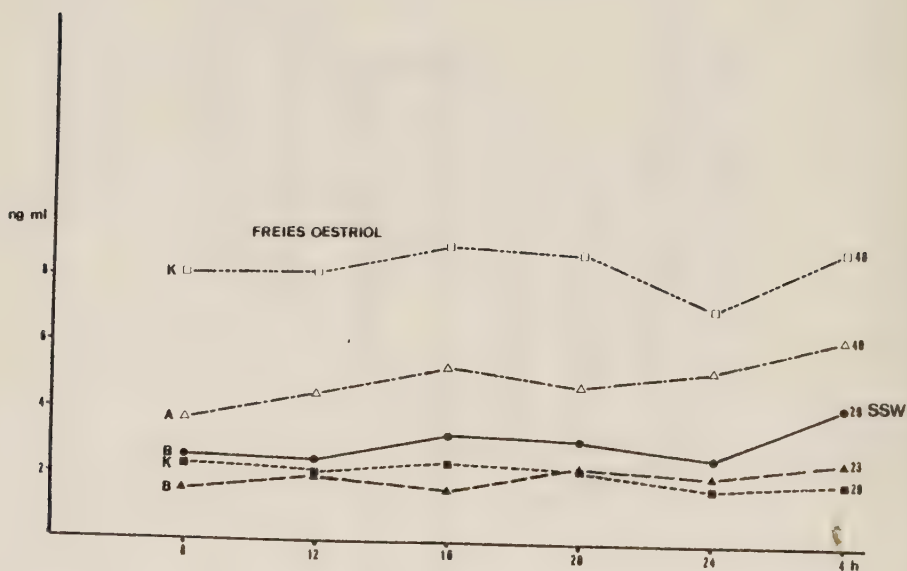
$p < 0.001$

Abbildung 3:

Freies Oestriol im Plasma gesunder Schwangerer während eines Tages

Die Buchstaben (K, A, B, K, B) sind die Anfangsbuchstaben der Namen der 5 Patientinnen, bei denen in regelmäßigen Abständen von 4 Stunden Blutentnahmen über 24 Stunden gemacht wurden, um das evtl. Vorliegen eines Tagesrhythmus von freiem Oestriol im Plasma festzustellen.

Die Zahlen (40, 40, 29, 23, 29) entsprechen der Zahl der Schwangerschaftswochen (SSW) der jeweiligen Patientin



n = 5

Abbildung 4:

Gesamt-Dehydroepiandrosteron im Plasma gesunder Schwangerer während
eines Tages

Die Buchstaben (K, B, K, A, B) sind die Anfangsbuchstaben der Namen der Patientinnen, bei denen in regelmäßigen Abständen von 4 Stunden Blutentnahmen über 24 Stunden gemacht wurden, um das evtl. Vorliegen eines Tagesrhythmus von Gesamt-DHEA im Plasma festzustellen.

Die Zahlen (40, 23, 29, 40, 29) entsprechen der Zahl der Schwangerschaftswochen (SSW) der jeweiligen Patientin.

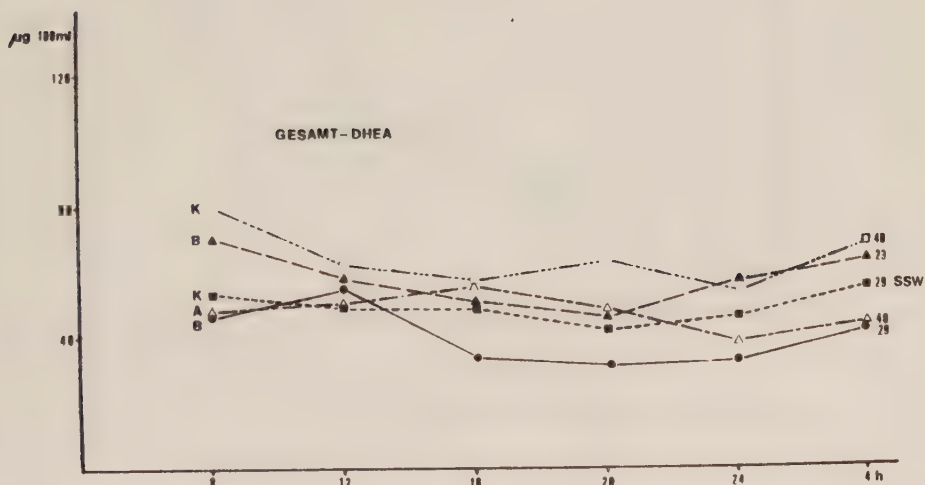
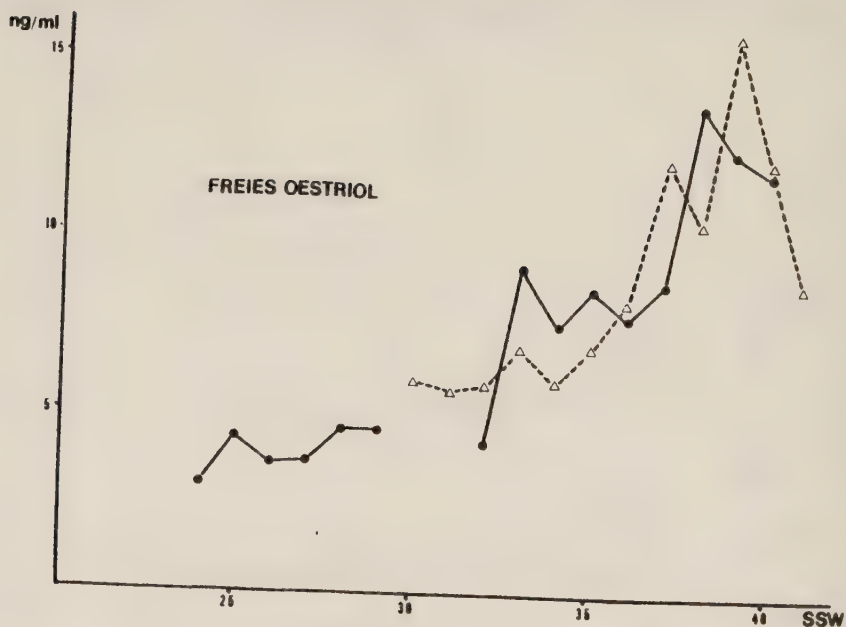


Abbildung 5:

Freies Oestriol im Plasma gesunder Schwangerer während
des letzten Trimenons



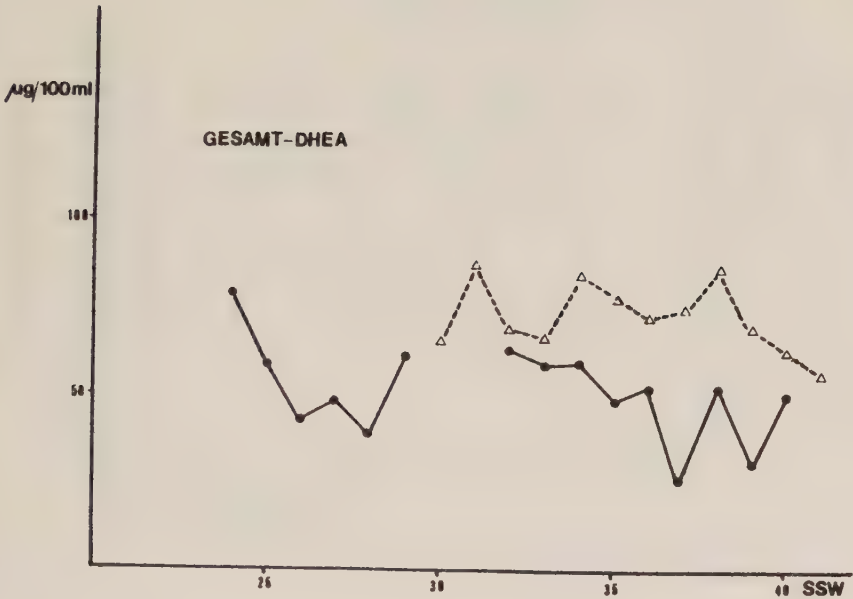
n = 2

●—●—●—● = Fall 1

Δ---Δ---Δ = Fall 2

Abbildung 6:

Gesamt-Dehydroepiandrosteron im Plasma gesunder Schwangerer
während des letzten Trimenons



n = 2

●—●—●—● = Fall 1

△--△--△--△ = Fall 2

Abbildung 7:

Verlaufskontrolle von Östriol bei EPH-Gestose

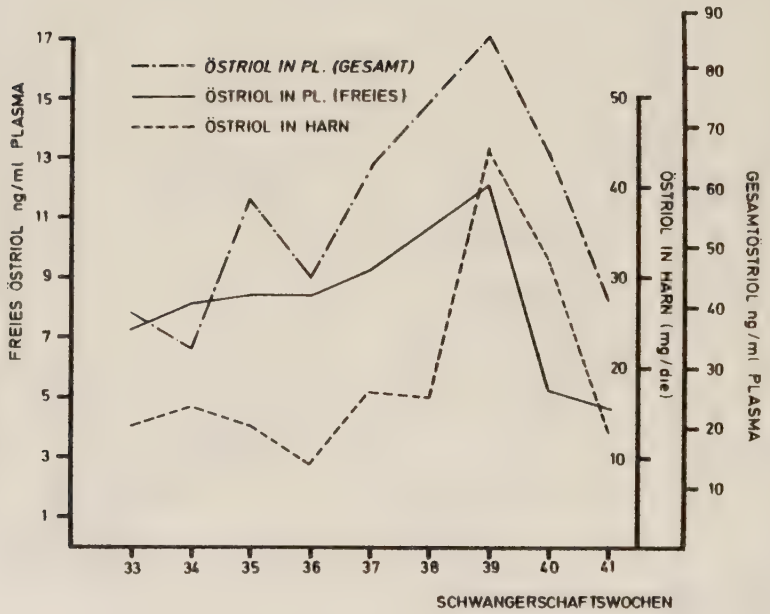


Abbildung 8:

Verlaufskontrolle von Oestriol bei chronischer Glomerulo-
nephritis

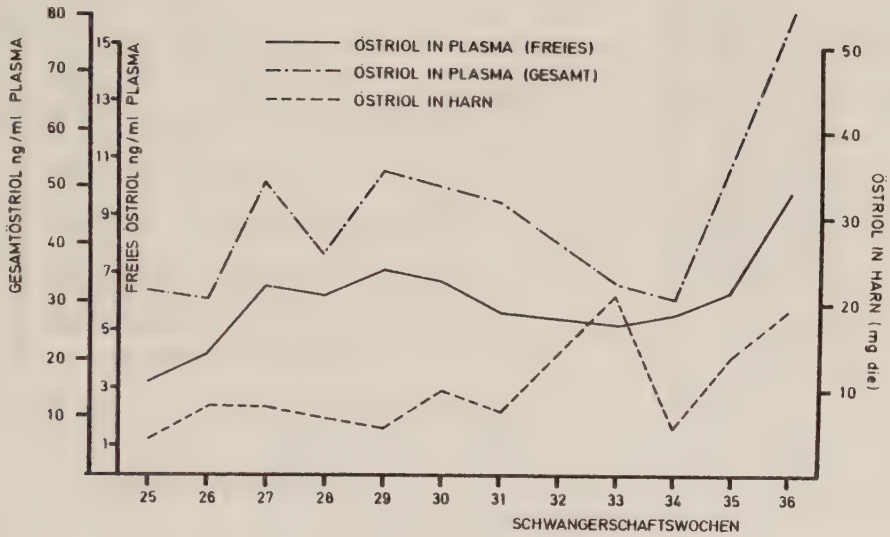
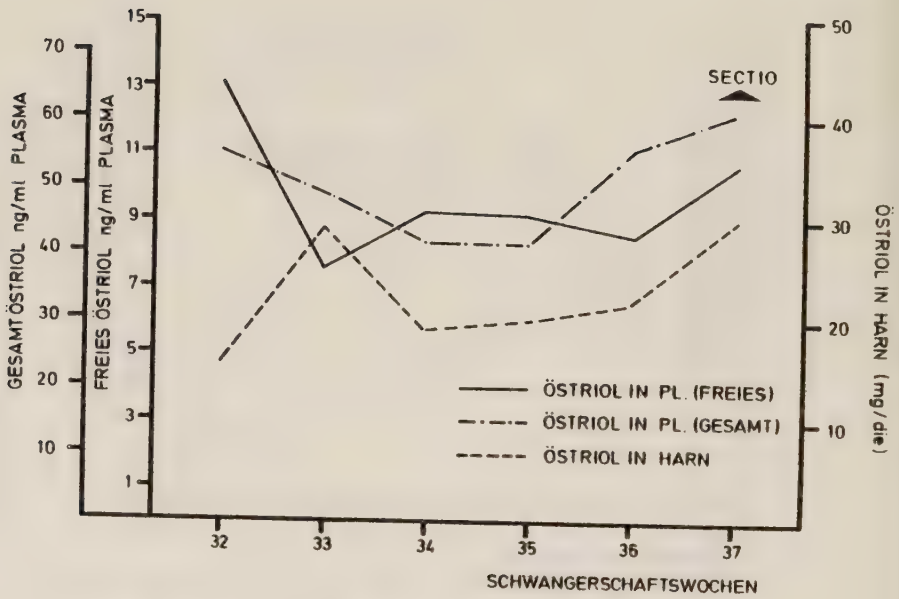


Abbildung 9:

Verlaufskontrolle von Östriol bei manifestem Diabetes



DISKUSSION

Nachdem sich die Oestriolbestimmung im Harn schon seit einigen Jahren zur Überwachung von Risikoschwangerschaften bewährt hat (30), fand - wie bereits zu Anfang erwähnt - in der letzten Zeit die Bestimmung des Serum-Oestriols zum Nachweis fetaler Gefahrenzustände zunehmendes Interesse. Die klinische Brauchbarkeit der Oestriolbestimmung ist dabei von der Zuverlässigkeit und Praktikabilität der analytischen Verfahren abhängig. Wird die Zuverlässigkeit der Oestriolbestimmung im Harn durch Harnbestandteile wie Glukose oder Medikamente ggf. stark beeinträchtigt (8), so daß eine Abtrennung dieser Substanzen erforderlich wird, so ist die Unterscheidung zwischen Oestriol und Gesamt-Oestrogenen bei derartigen Untersuchungen von geringerer Bedeutung (25). Da der Anteil des Oestriols an den Gesamt-Oestrogenen des Harns, d.h. den Koberchromogenen, bei annähernd 85% liegt, kann die Spezifität somit zugunsten der Praktikabilität der Analyse vernachlässigt werden (14). Für die Bestimmung des Oestriols im Serum dagegen ist die Spezifität der Methode von ausschlaggebender Bedeutung; denn hier beläuft sich der Anteil des gesamten Oestriols nur auf etwa 40% der Gesamtoestrogene und der Anteil des freien Oestriols nur auf etwa 20% der unkonjugierten Oestrogene (1). Aufgrund solcher Relationen sollten die Ergebnisse einer etwaigen Bestimmung von Gesamt-Oestrogenen mit Hilfe von Anti-Oestriol-C-16,C-17-Dikonjugat-Antiseren für die Abschätzung der Oestriolkonzentration im Serum nicht hinreichend repräsentativ sein. Die Methoden zur spezifischen Bestimmung des Gesamt-Oestriols erfordern im allgemeinen eine Säurehydrolyse der Oestriol-Konjugate, bei der in unterschiedlichem Ausmaße Steroide zerstört werden (15). Dieser als kritisch anzusehende Analysenschritt kann jedoch umgangen werden, indem man sich auf die Bestimmung des freien Oestriols beschränkt. Letzteres läßt sich leicht durch Ätherextraktion von den

Konjugaten abtrennen. Auf der anderen Seite verringert sich wegen der niedrigen Konzentration des freien Oestriols die Meßgröße um beinahe 90%. Angesichts der großen Empfindlichkeit radioimmunologischer Methoden ist ein derartiger Einwand jedoch von geringer Bedeutung. Im Ätherextrakt des Schwangerenserums liegen zahlreiche Oestrogene vor, von denen Oestron und Oestradiol die Konzentration des Oestriols erreichen bzw. übertreffen. Aus diesem Grunde ist zur Bestimmung des Oestriols eine Auftrennung der Oestrogene oder aber der Einsatz oestriolspezifischer Reagenzien unabdingbar. Für die Auftrennung der freien Oestrogene eignet sich dabei z.B. die Chromatographie an Sephadex LH-20, die von WU und LANDY (29) zur Bestimmung von Oestriol im Schwangerenserum auch benutzt wurde. Als Routineverfahren zur Überwachung von Schwangerschaften aber scheint dieser Weg zu aufwendig. Erst der Einsatz eines spezifischen Antioestriol-C-6-Konjugat-Antiserums gestattet die Bestimmung von Oestriol neben anderen Oestrogenen. Da die Kreuzreaktion dieses Antiserums mit Oestron und Oestradiol unter 0,01% bzw. 0,5% liegt, gelingt hier eine direkte chromatographiefreie Bestimmung von Oestriol im Schwangerenserum. Betrachtet man nun die Ergebnisse, die bei der Bestimmung des freien Oestriols im Serum von Schwangeren während des letzten Trimenons gewonnen wurden, so zeigt sich ein steter Anstieg von rund 4 ng/ml während der 29./30. Woche bis zu 13 ng/ml in den letzten beiden Schwangerschaftswochen (Tab. 2, Abb. 1). Wenngleich in der 29./30. und der 41./42. Schwangerschaftswoche die Zahl der Einzeluntersuchungen nur 13 bzw. 19 betrug gegenüber rund 60 während der 35. - 40. Schwangerschaftswoche, so entsprechen diese Werte doch weitgehend denjenigen, die von GOEBEL und KUSS (9) berichtet wurden. Selbst die relative Vergrößerung der Standardabweichung um die 32./33. Schwangerschaftswoche

findet sich in den Untersuchungen der letztgenannten Autoren. Angesichts einer Richtigkeit der hier benutzten Methode von $97 \pm 2\%$ im Konzentrationsbereich zwischen 100 pg und 10 ng, einer Präzision, die bei einem Mittelwert von 9,7 ng/ml zu einer Standardabweichung von 0,2 ng/ml führte und einer Empfindlichkeit von etwa 30 pg/Probe, sollten die Anforderungen, die an die Zuverlässigkeit eines solchen Verfahrens gestellt werden, ohne weiteres erfüllt sein. Der Versuch, in den gleichen Plasma- bzw. Serumproben auch das Gesamt-Oestriol zu erfassen, brachte die in Abb. 2 gezeigten Resultate. Hier stieg die Konzentration des Gesamtoestriols von rund 30 ng/ml in der 29./30. Woche der Schwangerschaft auf rund 57 ng/ml in der 39./40. Woche. Bei der Bestimmung des Gesamtoestriols kann es jedoch zu großen Verlusten durch die Hydrolyse der Oestriolkonjugate kommen. Bereits vor Jahren von MARRIAN und BAULD (20) sowie von BROWN (3) durchgeführte ausgedehnte Untersuchungen über die Säurehydrolyse von Oestriolkonjugaten veranschaulichten, daß eine länger dauernde Säurehydrolyse zwar die Ausbeute an Oestrogen-Konjugaten verbessert, dafür aber die chemische Veränderung funktioneller Gruppen insbesondere in Ring D begünstigt. Als Optimum wurde von besagten Autoren eine 60-minütige Hydrolyse in 15% konzentrierter Salzsäure durch Kochen unter Rückfluß vorgeschlagen. Wiederauffindungsversuche, wie sie von NACHTIGAL u.a. (22) sowie von BASSETT und LEWITZ (2) oder SCHINDLER u.a. (24) vorgenommen wurden unter Verwendung verschiedener Oestriolkonjugate wie Oestriol-16-glucuronosid oder Oestriol-3-glucuronosid ließen überdies erkennen, daß die Anwesenheit von verschiedenen Pharmaka, die während der Säurehydrolyse zur Bildung von Formaldehyd führen, die Ausbeute von Oestriol in bemerkenswerter Weise beeinträchtigen. Auch in Gegenwart von verschiedenen Zuckern kommt es bei der Säurehydrolyse solcher Oestriol-Konjugate zu beträchtlichen Verlusten an Oestriol, die

bis zu 50% und mehr erreichen können. Da nach bisher unveröffentlichten Versuchen von DERTEL und Mitarbeitern eine Sulfatgruppe an C-3 während der Säurehydrolyse rascher abgespalten wird als etwa der Glucuronsäurerest an C-3, dieser aber wieder schneller hydrolysiert als ein Glucuronsäurerest an C-16 - in den letztgenannten Fällen handelt es sich ja um die Hydrolyse einer Ätherverbindung bzw. glycosidischen Bindung - so sollte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Oestriol-Konjugate sich ohne weiteres bei der Hydrolyse rate und damit zugleich bei der Zerstörung freigesetzten Oestriols bemerkbar machen. Eigene Hydrolyseversuche bestätigten derartige Überlegungen. Eine kürzere Hydrolysezeit führte zu geringeren Ausbeuten, aber auch einer geringeren Zerstörung freigesetzten Oestriols, während bei längerer Hydrolyse eine höhere Wiederauffindungsrate an Gesamt-Oestrogenen, dafür allerdings eine weitergehende Bildung von Artefakten aus freigesetztem Oestriol festzustellen war. Angesichts solcher Schwierigkeiten scheint die Routinebestimmung des freien Oestriols einer Analyse des Gesamt-Oestriols im Plasma deutlich überlegen. Die normalerweise mit 13 - 24% zu veranschlagenden Verluste, vor allem bei der Hydrolyse, können unter pathologisch veränderten Bedingungen nämlich 50% ohne weiteres überschreiten. Im Rahmen letztgenannter Untersuchungen erhob sich die Frage, ob die Bestimmung des Gesamt-Oestriols im Plasma oder Serum mit der des Gesamt-Oestriols im Harn verglichen werden kann. In 182 der insgesamt 267 zählenden Plasma-Analysen lagen auch die Konzentrationen des Gesamt-Oestriols im Harn vor. Sie waren nach der halbautomatischen Methode von BROWN u.a. (4) ermittelt worden. Der Korrelationskoeffizient zwischen der Konzentration des Gesamt-Oestriols im Plasma und der des Gesamt-Oestriols im 24-Stunden-Harn belief sich auf 0,53, d.h. $p < 0,001$, es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Hydrolyserate und Zerstörung freigesetzten Oestriols dürften hier für relativ große Schwankungen der beiden Parameter verantwortlich sein. Betreffs der Tagesschwankungen freien Oestriols im Plasma von fünf Schwangeren in der 23. - 40. Schwangerschaftswoche ergaben sich keine wesentlichen Veränderungen in der Konzentration des freien Steroids, wenn sich auch eine geringfügige Erhöhung der Plasmaspiegel um 4 Uhr morgens bei vier der untersuchten Patientinnen abzeichnete. Eine ausgesprochene Tagesrhythmik der Oestriolkonzentrationen im Serum, wie sie von GOEBEL und KUSS (9) gefordert wurde, ließ sich jedoch nicht nachweisen (Abb. 3). Eine eindeutige Aussage in diesem Hinblick wird durch die geringe Zahl der hier untersuchten Fälle natürlich erschwert. Aufgrund solcher Resultate sollte eine Schwangerschaftsüberwachung durch Bestimmung des freien Oestriols im Plasma eine zeitlich abhängige Blutentnahme erübrigen. Da, wie in der Einleitung bereits angegeben, die Bildung des Oestriols im wesentlichen aus Dehydroepiandrosteron bzw. 16 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron erfolgt, schien es von Interesse, in den vorliegenden Fällen auch die Konzentration des Gesamt-Dehydroepiandrosterons im Plasma der fünf Probandinnen zu erfassen. Auch hier konnte, wie in Abb. 4 dargestellt, eine eindeutige Tagesrhythmik im Gegensatz zu früheren Befunden bei Nichtschwangeren nicht nachgewiesen werden. Die geringe Zahl der Untersuchungen erlaubte jedoch keine statistische Auswertung der Ergebnisse bzw. die Korrelation der beiden genannten Parameter. Daß allerdings Zusammenhänge bestehen zwischen der Oestriolproduktion und Dehydroepiandrosteron bzw. seinem Sulfo-konjugat ist den ausgedehnten Untersuchungen von LAURITZEN und Mitarbeitern (18) zu entnehmen, die eine Umwandlung intravenös injizierten Dehydroepiandrosteronsulfats in Oestrogene bzw. Oestriol zur Funktionsdiagnostik der Plazenta benutzten. Die Verlaufskurve der

Konzentrationen von freiem Oestriol und Gesamt-Dehydroepiandrosteron im Plasma von zwei Schwangeren ist in den Abb. 5 und 6 dargestellt und zeigt einen deutlichen Anstieg des freien Oestriols bei eher absinkenden Plasmaspiegeln des Gesamt-Dehydroepiandrosterons. Ob letztere Beobachtung eine verstärkte Heranziehung maternalen Dehydroepiandrosteron-Sulfatids zur Oestriol-Synthese anzeigt, d.h. eine verstärkte Aromatase-Tätigkeit in der Plazenta, kann z.Zt. nicht entschieden werden. In jedem Falle scheint erwiesen, daß die Konzentration des Gesamt-Dehydroepiandrosterons, d.h. insbesondere des Dehydroepiandrosteron-Sulfatids, im Plasma der Schwangeren mit zunehmender Schwangerschaft eher ab- als zunimmt, wogegen die Konzentration des freien Oestriols wie auch des Gesamt-Oestriols im Plasma einen Anstieg erfährt. Handelte es sich bei den bisher beschriebenen Untersuchungen um die Bestimmung des freien Oestriols oder des Gesamt-Oestriols im Serum normaler Schwangerer, so soll jetzt kurz auf die Analyse besagter Parameter im Plasma bei pathologischen Schwangerschaften eingegangen werden. Die Analyse des freien Oestriols und des Gesamt-Oestriols im Plasma und Harn einer 43-jährigen Primipara mit leichter EPH-Gestose zeigte einen Anstieg aller drei Parameter bis zur 39. Schwangerschaftswoche (Abb. 7). Dann kam es allerdings zu einem kontinuierlichen Abfall bis zur Entbindung eines 3000 g schweren Kindes, welches offensichtlich Zeichen einer Übertragung aufwies. Eine entsprechende Übereinstimmung ließ sich bei einer Schwangeren mit histologisch gesicherter, chronischer Glomerulonephritis nachweisen. Hier ergab die Verlaufskontrolle des Oestriols im Plasma und Harn konstant niedrige Oestriolkonzentrationen im Harn bei vergleichsweise hohen Plasmaspiegeln. Hätte man sich in diesem Falle auf die Bestimmung des Gesamt-Oestriols im Harn beschränkt, so wäre die erniedrigte Exkretion des Oestriols als Hinweis für eine

Gefährdung des Feten angesehen worden, was möglicherweise eine Sectio caesarea nach sich gezogen hätte. Die Bestimmung des Oestriols im Serum dagegen veranschaulichte, daß die erniedrigte Ausscheidung von Oestriol lediglich auf ein Versagen der Niere zurückzuführen war (Abb. 8). Bei einer Schwangeren mit manifestem Diabetes ergab die Verlaufskontrolle von freiem Oestriol und Gesamt-Oestriol in Plasma und Harn zwar zunächst normale Werte, doch kam es zu keinem weiteren Anstieg besagter Parameter, wie bei der normalen Schwangerschaft. Derartige Beobachtungen sprechen ohne weiteres für eine zunehmende Störung des Stoffwechsels in der Plazenta und eine Gefährdung des Feten, die klinisch-therapeutische Konsequenzen fordert. Aufgrund der hier berichteten Untersuchungsergebnisse, die mit den inzwischen von GOEBEL und KUSS (9) publizierten Resultaten völlig übereinstimmen, läßt sich zunächst feststellen, daß die Bestimmung des freien Oestriols im Serum für eine Überwachung der Schwangerschaft ohne weiteres geeignet ist. Eine rasche und zeitlich unabhängige Gewinnung des Untersuchungsmaterials stellt ebenso einen Vorteil gegenüber den gebräuchlichen Harnanalysen dar wie die einfache Durchführung der Bestimmung mit Hilfe des spezifischen Radioimmunoassays. Da hier die Hydrolyse von Oestriol-Konjugaten entfällt, sind die Zuverlässigkeitskriterien des Verfahrens, was Richtigkeit, Genauigkeit, Spezifität und Empfindlichkeit angeht, zumindest gleichwertig einer chemischen Bestimmungsmethode von Oestriol im Harn. Die Möglichkeit einer wiederholten Untersuchung während eines einzigen Tages stellt einen weiteren Vorteil gegenüber der Harnanalyse dar. Demgegenüber birgt die Bestimmung des Gesamt-Oestriols im Plasma infolge der bei Hydrolyse auftretenden unterschiedlichen Ausbeuten ähnliche Schwierigkeiten in sich wie die Bestimmung des Harn-Oestriols, zumal auch hier die Hydrolyse und Reinigung der Extrakte einen höheren

Arbeitsaufwand erfordern und somit ein Ergebnis verzögern. Eine Erleichterung der Endpunktbestimmung durch Einführung des Radioimmunoassays mit hochspezifischem Antiserum bringt keinen derartigen Vorteil für die Erfassung des Gesamt-Destriols, daß eine klinische Anwendung dieses Verfahrens gerechtfertigt erschiene. Die Bestimmung des freien Destriols im Plasma von 267 normalen Schwangeren, die Verlaufskontrolle über etliche Wochen bei normalen und pathologischen Schwangerschaften und die Feststellung einer fehlenden Tagesrhythmik veranschaulichen die Brauchbarkeit der hier beschriebenen Untersuchungsmethode für die klinische Diagnostik.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Plasma von 267 gesunden Schwangeren während des letzten Trimenons wurden freies Oestriol und Gesamt-Oestriol mittels Radioimmunoassays bestimmt. Während das freie Steroid durch Ätherextraktionen gewonnen wurde, erfolgte die Analyse des Gesamt-Oestriols durch Hydrolyse des Plasmas in 15%iger Salzsäure, die Extraktion der freigesetzten Steroide mittels Äther und Reinigung der Ätherextrakte in üblicher Weise. Für die Endpunktbestimmung durch Radioimmunoassays stand hochspezifisches Oestriol-C-6-Konjugat-Antiserum zur Verfügung. Die Ergebnisse der Bestimmung des freien Oestriols im Plasma entsprechen weitgehend den Resultaten, wie sie von anderen Autoren inzwischen publiziert wurden und lassen einen stetigen Anstieg von rund 4 ng/ml in der 29./30. Woche bis zu 14 ng/ml während der 41./42. Woche erkennen. Die Analyse des Gesamt-Oestriols erbrachte gleichfalls einen deutlichen Anstieg von etwa 30 ng/ml zu Beginn des letzten Trimenons auf rund 57 ng/ml gegen Ende der Schwangerschaft. Verluste bei Säurehydrolyse durch unterschiedliche Zusammensetzung der Oestriol-Konjugate im Plasma können hier eine wesentliche Rolle spielen. Eine Bestimmung des freien Oestriols im Plasma von fünf normalen Schwangeren über 24 Stunden in 4-stündigem Abstand ließ keinen eindeutigen Tagesrhythmus erkennen. Dieser fehlte auch bei dem gleichzeitig analysierten Dehydroepiandrosteron. Bei zwei gesunden Schwangeren verfolgte man letztgenannte Parameter während des letzten Trimenons. Während das freie Oestriol erwartungsgemäß anstieg, zeigte sich bei Dehydroepiandrosteron eher ein Abfall der Plasmakonzentrationen. Schließlich wurde anhand von drei Verlaufskontrollen des Oestriols im Plasma bei pathologischen Schwangerschaften die Brauchbarkeit der Plasmaanalyse dargelegt, für die sich vor allem die Erfassung des freien Oestriols eignen dürfte.

LITERATUR

1. AHMED, J. and KELLIE, A.E.:
Estrogen and estrogen conjugate concentration in late pregnancy plasma.
J. Steroid. Biochem. 4, 1-10 (1973)
2. BASSETT, M. and LEVITZ, M.:
A modification of our method for the determination of plasma estriol in pregnancy.
J. clin. Endocrinol. Metab. 28, 1067-1070 (1968)
3. BROWN, J.B.:
A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine.
Biochem. J. 60, 185-193 (1955)
4. BROWN, J.B., McLEOD, S.C., McNaughton, C., SMITH, C. and SMYTH, B.:
A rapid method for measuring oestrogens in human urine using a semi-automatic extraction.
J. Endocrinol. 42, 5-15 (1968)
5. CARRINGTON, E.R., OESTERLING, M.J. and ADAMS, F.M.:
Renal clearance of estriol in complicated pregnancy.
Am. J. Obstetr. Gynecol. 106, 1131-1143 (1968)
6. DICZFALUSY, E.:
The fetoplacental unit. A. PECILE and C. Eds.
Excerpta Med. 1969, S. 65 ff.
7. FRANDSEN, V.A., JORGENSEN, P.I. and SVENSTRUP, B.:
The adventures of one thousand and one obstetrical patients assessed by estriole excretion.
Ann. Clin. Res. 2, 354-362 (1970)
8. FRANDSEN, V.A., PEDERSEN, J. and STAKEMANN, G.:
Urinary oestriol excretion in diabetic pregnancy.
Acta Endocrinol. 40, 400-409 (1962)
9. GOEBEL, R. und KUSS, E.:
Oestrogene in der Schwangerschaft. I. Eine einfache und zuverlässige radioimmunologische Bestimmung des Oestriols im Schwangerschaftsserum.
Geburtsh. Frauenheilk. 34, 329-338 (1974)
10. GOEBEL, R. und KUSS, E.:
Oestrogenbestimmungen bei 1000 Risikoschwangerschaften.
Arch. Gyn. 214, 446-448 (1973)

- EBELSMANN, U. und JAFFE, R.B.: Oestriol metabolism in pregnant women.
Acta Endocrinol. 66, 679-693 (1971)
- EPIDE, E., GIEBENHAIN, M.E., Radioimmunoassay for estrogens in human pregnancy urine, plasma and amniotic fluid.
Am. J. Obstetr. Gynecol. 109, 897-906 (1971)
- EPER, A.: Estriol in liquor amni.
Am. J. Obstetr. Gynecol. 112, 459-471 (1972)
- ES, E.: Klinisch-chemische Untersuchungen zur Überwachung der gefährdeten Schwangerschaft.
Gynäkologie 7, 124-150 (1974)
- ES, E.: Bestimmung der Gesamtoestrogene in der Schwangerschaft.
Z. klin. Chem. 8, 339-344 (1970)
- ES, E., GOEBEL, R. und ZANDER, J.: Hormone determination in the management of pregnancies. In: Hormonal investigations in human pregnancy.
SCHOLLER, R. Ed., Paris 1974
- INSKY, S. and CHI, D.: Estriol and creatinine in pregnancy urine.
Obstetr. Gynecol. 41, 343-346 (1973)
- IRITZEN, C.: A clinical test for placental functional activity using DHEA-Sulphate and ACTH-injections in the pregnant woman.
Acta Endocrinol. Suppl. 119, 188 (1967)
- AFEE, C.A., BEISCHER, N.A., Fetoplacental function and antenatal complications when the fetus is malformed.
Aust. N.Z. J. Obstetr. Gynaecol. 12, 71-85 (1972)
- W, J.B. and FORTUNE, D.W.: (1972)
- IRIAN, G.F. and BAULD, W.S.: Hydrolysis of the conjugated estrogens in human urine.
Acta Endocrinol. 7, 240-256 (1951)
- SON, G.M.: Plasma oestriol concentration during normal pregnancy.
J. Obstetr. Gynecol. Brit. Commonw. 80, 201-205 (1973)

22. NACHTIGALL, L., BASSETT, M.,
HOGSANDER, U., SLAYLE, S. and
LEVITZ, M.:
A rapid method for the assay of plasma estrogens in pregnancy.
J. clin. Endocrinol. Metab. 26, 941-948
23. RUNNEBAUM, B. und HOLZMANN, K.:
Methoden zur Bestimmung von Oestriol in Schwangerschaft.
Z. klin. Chem. 8, 345-353 (1970)
24. SCHINDLER, A.E., RATANASOPA, V.
and HERMANN, W.L.:
Acid hydrolysis of urinary estriol.
Clin. Chem. 13, 186-195 (1967)
25. SCHWERS, J.:
Les oestrogenes au cours de la seconde moitié de grossesse.
Arscia, Brüssel 1965
26. TIMONEN, S., HIRVONEN, E. and
SOKKANEN, R.:
Urinary volume and excretion of oestrogen in late pregnancy.
Acta Endocrinol. 49, 393-402 (1965)
27. TIKKANEN, N.J.:
Urinary excretion of estriol conjugates in normal pregnancy.
J. Steroid Biochem. 4, 57-63 (1973)
28. TREIBER, L.R., RINDT, W. und
OERTEL, G.W.:
Zur Bestimmung von Ketosteroiden mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. II. Anwendung der Methode bei Plasmaanalysen.
Z. klin. Chem. 5, 102-106 (1967)
29. WU, C.H. and LUNDY, L.E.:
Radioimmunoassay of plasma estrogens.
Steroids 18, 91-111 (1971)
30. WYSS, H.L.:
Oestriol- und Pregnan diol-Ausscheidung in der zweiten Schwangerschaftshälfte.
Hans-Huber-Verlag, Bern 1970

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn
Prof. Dr. G.W. Oertel für die Überlassung
des Themas und seine freundliche Unter-
stützung und Förderung danken.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der
Abteilung für Experimentelle Endokrinologie
für die nette Aufnahme im Laboratorium.

LEBENS LAUF

Geburtsdatum	14. Juli 1951
Geburtsort	Graz/Österreich
Eltern	Valentin Schuy Katherina Schuy geb. Negelli
Schulbildung	1958 - 1962 Volksschule Alsb (Bergstraße) 1962 - 1970 Liebfrauenschule Bensheim (Bergstr.)
Schulabschluß	Abitur 5. Juni 1970
Studium	1970 - 1976 Johannes Gutenberg Universität Mainz Vorphysikum: 29.9.1971 Physikum: 22.3.1973
Staatsexamen	Beginn Februar 1976

MEMORANDUM

1. Purpose	to inform you of the results of the study conducted by the Research Department during the past year.
2. Summary	The study was conducted by the Research Department during the past year. The results of the study are as follows:
3. Findings	The study found that the majority of the subjects (75%) were satisfied with the results of the study. The remaining 25% of the subjects were not satisfied with the results of the study.
4. Recommendations	It is recommended that the study be repeated in the future. The study should be repeated in the future to determine if the results of the study are consistent.
5. Conclusion	The study found that the majority of the subjects (75%) were satisfied with the results of the study. The remaining 25% of the subjects were not satisfied with the results of the study.
6. Action	It is recommended that the study be repeated in the future. The study should be repeated in the future to determine if the results of the study are consistent.
7. Distribution	The study was conducted by the Research Department during the past year. The results of the study are as follows:
8. Date	10/1/77
9. Author	John Doe
10. Reviewer	John Doe

